

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 347**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2005 E 05821484 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1812043**

54 Título: **Uso de eritropoyetina para el tratamiento de la ataxia de Friedreich**

30 Prioridad:

09.11.2004 AT 18692004

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.06.2014

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE UNIVERSITAT WIEN (100.0%)
SPITALGASSE 23
1090 WIEN, AT**

72 Inventor/es:

**SCHEIBER-MOJDEHKAR, BARBARA y
STURM, BRIGITTE, NINA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 470 347 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de eritropoyetina para el tratamiento de la ataxia de Friedreich

La presente invención tiene que ver con el uso de eritropoyetina para el tratamiento de la ataxia de Friedreich.

5 La ataxia de Friedreich (FRDA) es la más común de las ataxias hereditarias, que afecta a 1 de cada 50.000 personas. Clínicamente, la FRDA se caracteriza por múltiples síntomas que incluyen ataxia progresiva del caminar y de los miembros, disantria, diabetes melitus y cardiomiopatía hipertrófica (1).

10 La ataxia de Friedreich está causada por la expansión del trinucleótido GAA en el gen de la frataxina localizado en el locus del cromosoma 9q13, dando como resultado una reducción de la expresión de la frataxina, una pequeña proteína mitocondrial (2). Debido a la localización mitocondrial de la frataxina, se piensa que las degeneraciones neurológicas y cardiológicas observadas en la FRDA son el resultado de un defecto mitocondrial (3). La función fisiológica exacta de la frataxina es desconocida, pero puede estar implicada en la homeostasis del hierro mitocondrial y/o el ensamblaje de las proteínas hierro azufre (FeS) y la síntesis de hemo. Se ha postulado que la acumulación de hierro intramitocondrial inicia la producción de radicales hidroxilo por la química de Fenton, conduciendo a la inactivación de las enzimas FeS, la peroxidación de lípidos y el daño a los ácidos nucleicos, las proteínas y produciendo en última instancia la muerte celular.

15 Existe cierto debate sobre si la acumulación de hierro mitocondrial en el interior de la mitocondria es el resultado o la causa del estrés oxidativo que es responsable de la lesión mitocondrial. Los estudios con modelos de ratón con un gen desactivado condicional y células de pacientes con FRDA indican que las deficiencias en las enzimas FeS preceden a la acumulación de hierro (4). Clínicamente existe acumulación de hierro intramitocondrial en el corazón, el hígado, el sistema nervioso y el bazo de pacientes con FRDA, así como una reducción de ADN mitocondrial, de las subunidades que contienen agrupaciones de FeS de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (complejo I-III) y de la enzima aconitasa (5). La presencia de un aumento de los niveles de receptor de transferrina soluble como indicador de deficiencia de hierro citosólico es controvertida pero en general los pacientes con FRDA tienen concentraciones de hierro y ferritina en suero normales. Esto implica que la frataxina es necesaria para la biosíntesis normal de hemo, pero no existen informes de que la FRDA esté comúnmente asociada con anemia.

20 La estimulación de la frataxina con sustancias exógenas se demostró con hemina y ácido butírico, y con sustancias que generan especies de oxígeno reactivo (tales como ácido 3-nitropropiónico) (6) o aquellos que son citotóxicos como el cisplatino.

30 No se encuentra disponible en la actualidad un tratamiento de la FRDA especialmente para los déficits neurológicos. Sin embargo, la mejor comprensión del papel de la frataxina ha conducido a la consideración de antioxidantes tales como la ldebenona y quelantes de hierro como agentes terapéuticos potenciales. Se demostró una función cardioprotectora de la ldebenona en un modelo de ratón. Estos fármacos pueden tener potencial para reducir algunas características clínicas de la FRDA, pero no pueden curar la enfermedad por sí solos.

Otro enfoque para tratar la FRDA sería la terapia génica, que no será fácilmente obtenible en el futuro próximo.

35 Shigeru Taketani (Tohoku J. Exp. Med., 2005, 205, 297-318) informa sobre las funciones y la regulación del metabolismo del hierro en la mitocondria, en el que la proteína frataxina, cuya expresión disminuye en pacientes que padecen ataxia de Friedreich, juega un papel importante, y sugiere que esos descubrimientos se pueden utilizar para obtener un beneficio clínico en esta enfermedad.

40 En el documento WO 01/82953 A se describe el uso de α -MSH y/o EPO para el tratamiento de la inflamación en condiciones no isquémicas. Entre las numerosas enfermedades y afecciones que pueden ser tratadas supuestamente se mencionan los trastornos neuromiopáticos tales como la ataxia de Friedreich.

En el documento WO 02/064085 A, se describe una terapia simultánea para el tratamiento de las disfunciones neurológicas, que comprende la administración de uno o más sulfamatos de fructopiranosos y eritropoyetina.

45 Los derivados de eritropoyetina se describen. p. ej. en Science, Vol. 305, págs. 239-242. Otras variantes de eritropoyetina se describen p. ej., en el documento US 2004157293 A1.

Por lo tanto un objeto de la presente invención es proporcionar una preparación farmacéutica para el tratamiento de la ataxia de Friedreich y para el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con la misma mediante la disminución de la expresión de frataxina.

50 La invención consiste en el uso de eritropoyetina humana o un derivado de la misma que tiene la actividad biológica de la eritropoyetina humana de incrementar la expresión de frataxina para la producción de una preparación farmacéutica para el tratamiento de la ataxia de Friedreich o para la prevención de una enfermedad asociada con la misma mediante la disminución de la expresión de la frataxina.

El término "derivado de eritropoyetina humana" significa

- cualquier polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina pero difiera en el residuo azúcar de la eritropoyetina humana, y
- cualquier variante de eritropoyetina seleccionada del grupo de la eritropoyetina carbamílada (CEPO), asialoeritropoyetina, aranesp, S100-EPO y R103E-EPO.

La presente invención se refiere al uso de una preparación farmacéutica que contiene eritropoyetina humana, eritropoyetina recombinante o derivados de eritropoyetina como se ha definido anteriormente y un portador adecuado, en una dosificación de 400-40.000 Unidades por semana para el tratamiento de la ataxia de Friedreich y/o para el tratamiento y la prevención de una enfermedad asociada con la misma, que muestra una disminución de la expresión de frataxina.

La preparación farmacéutica se puede administrar en forma de disolución para inyectable o para infusión, o en forma de un producto liofilizado, p. ej., por vía intravenosa, intramuscular, intracraneal o intranasal (como pulverización nasal). La invención está dirigida adicionalmente a una nueva aplicación médica de una preparación farmacéutica que contiene eritropoyetina humana, eritropoyetina humana recombinante o derivados de eritropoyetina para su uso para incrementar la expresión de la proteína frataxina.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la eritropoyetina humana y los derivados descritos más arriba pueden incrementar significativamente la expresión de la frataxina en diversos tipos de células, p. ej., en linfocitos primarios de pacientes con FRDA de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto la eritropoyetina humana o un derivado de la misma descritos anteriormente se pueden utilizar para la producción de una preparación farmacéutica para el tratamiento de la ataxia de Friedreich o una enfermedad asociada con la misma en un paciente que padece ataxia de Friedreich.

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína ácida de aproximadamente 34.000 dalton de peso molecular que existe en tres formas: α , β y asialo. Las formas α y β difieren ligeramente en los componentes carbohidrato, pero tienen la misma potencia, actividad biológica y peso molecular. La forma asialo es una forma α y β con el carbohidrato terminal (ácido siálico) eliminado. La EPO está presente a concentraciones muy bajas en el plasma cuando el organismo se encuentra en estado sano en donde los tejidos reciben suficiente oxigenación desde los numerosos eritrocitos existentes.

La eritropoyetina posee actividades biológicas además de los efectos eritropoyéticos que originalmente proporcionaron su nombre. Recientemente la EPO humana recombinante (rhuEPO) ha recibido una atención considerable debido a sus amplias capacidades neuroprotectoras y cardioprotectoras por medio de un mecanismo escasamente conocido.

Los autores de la presente invención utilizaron fibroblastos y miocitos cardíacos humanos primarios y sometieron a ensayo la influencia de la rhuEPO sobre la expresión de la frataxina. Los autores de la presente invención encontraron un incremento significativo en los niveles de frataxina especialmente en fibroblastos cardíacos, en donde se pudo obtener un incremento de 2,5 veces después de 48 horas de rhuEPO. Este resultado es importante porque la causa principal de muerte prematura en la FRDA es la cardiomiopatía. El incremento de la expresión de frataxina en el corazón puede proteger el corazón frente al desarrollo de cardiomiopatía y por lo tanto podría incrementar la esperanza de vida. Por otra parte, puesto que se postula que la frataxina funciona como una proteína protectora del tejido, el aumento de la expresión de frataxina también podría representar una nueva diana para tratar la cardiomiopatía en la población general.

Muchos tipos de células producen eritropoyetina y muchas células además de los progenitores eritroides expresan el receptor de eritropoyetina, incluyendo las células del cerebro. El descubrimiento de que las células neuronales producen EPO en respuesta a una variedad de insultos incluyendo isquemia/hipoxia, trauma, inflamación mediada por inmunidad, y exceso de excitación neuronal apoya adicionalmente la naturaleza pleiotrópica de esta citoquina. Utilizando células de carcinoma embrionario de ratón P19 (tipo neuronal) los autores de la presente invención encontraron incrementos significativos en la expresión de la frataxina después de la incubación con 6,6 U/ml y 9,9 U/ml de rhuEPO durante 24 y 48 horas (véanse las Figs. 3A y 3B de más abajo). Los experimentos de los autores de la presente invención con células de tipo neuronal P19 (véase la Fig. 4 de más abajo) también indican que los derivados de EPO con una vida media en plasma más corta que la rhuEPO, como la asialoeritropoyetina podrían ser una buena alternativa no eritropoyética a la rhuEPO. Esto se puede explicar por el hecho de que solamente un breve tiempo de incubación con rhuEPO ya conduce a un incremento en la expresión de frataxina y de que la rhuEPO no tiene que estar presente durante un período de tiempo prolongado para estimular un incremento de frataxina. Sin embargo, una aplicación controlada de rhuEPO eritropoyéticamente activa durante ciertos períodos acompañada eventualmente de flebotomía en caso de incremento del hematocrito también podría ser útil para reducir la acumulación de hierro mitocondrial desencadenando la biosíntesis de hemo mitocondrial y la eritropoyesis.

Este enfoque para reducir la carga de hierro mitocondrial se utiliza actualmente con éxito en otras enfermedades con acumulación de hierro mitocondrial como el síndrome mielodisplásico y la anemia sideroblástica. Semejante

protocolo podría ser útil especialmente para pacientes con grandes depósitos de hierro en el miocardio y el núcleo dentado porque los quelantes de hierro disponibles clínicamente en la actualidad no alcanzan los depósitos de hierro mitocondrial.

5 A lo largo de la última década, se ha demostrado que la rhuEPO es un agente terapéutico seguro en pacientes con hemodiálisis con efectos adversos mínimos. Para confirmar los efectos in vitro de la rhuEPO sobre la expresión de la frataxina, los autores de la presente invención midieron los niveles de frataxina en linfocitos obtenidos de pacientes en hemodiálisis que experimentan tratamiento con rhuEPO. Los autores de la presente invención pudieron encontrar un incremento significativo (hasta 3 veces) en la expresión de frataxina en linfocitos obtenidos de pacientes en hemodiálisis 48 horas después de recibir rhuEPO en comparación con los linfocitos obtenidos de los mismos
10 pacientes antes de la administración de rhuEPO. Los pacientes sufrieron enfermedad renal en fase terminal y recibieron dosificaciones de EPO que oscilaban de 3.000 a 10.000 U.

Esta observación indica que la terapia con EPO aumenta la expresión de frataxina en los pacientes. Los datos de los autores de la presente invención demuestran por primera vez que además de sus propiedades neuro- y cardio-protectoras la EPO incrementa la expresión de frataxina.

15 Una realización preferida de la presente invención se caracteriza porque dicha eritropoyetina humana o dicho derivado de la misma son del grupo que consiste en eritropoyetina humana recombinante, eritropoyetina α , eritropoyetina β , aranesp, asialoeritropoyetina y eritropoyetina carbamilada.

De acuerdo con la presente invención, se ha diagnosticado la ataxia de Friedreich por medio de análisis genético y/o ELISA y/o PCR en tiempo real y la expresión de frataxina disminuye debido a la expansión de la repetición GAA o mutaciones en uno o ambos alelos del gen de la frataxina.
20

De acuerdo con las realizaciones preferidas la enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es

- una enfermedad cardíaca,
- diabetes,
- una enfermedad neurodegenerativa,
- 25 • una deformación ósea, en particular escoliosis y pie cavo,
- nistagmo,
- deterioro auditivo,
- una enfermedad ocular, en particular atrofia óptica,
- cáncer.

30 A continuación, se demuestra el efecto de la EPO sobre la expresión de la frataxina en diversos tipos de células.

Reactivos y anticuerpos

Todos los productos químicos se adquirieron de Sigma (Viena, Austria) si no se cita lo contrario. El anticuerpo policlonal de conejo primario contra frataxina humana y de ratón madura se preparó como se ha descrito previamente (7); el anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante se adquirió de DakoCytomation (Viena, Austria). La eritropoyetina humana recombinante (epoyetina beta) se obtuvo de Roche, Basilea, Suiza.
35

Cultivos Celulares

40 Linfocitos - Se recogieron linfocitos de 7 pacientes con FRDA (repeticiones GAA en el intervalo de 240 a 800) a partir de muestras de sangre fresca y se aislaron con Solución de Separación Biocoll, densidad 1,077 g/ml (Biochrom AG, Berlín, Alemania) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Finalmente, se diluyeron las células a una densidad de 1×10^6 células y se cultivaron en medio RPMI con un suplemento de suero de ternera fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y antibióticos y se utilizaron para los experimentos.

45 Células cardíacas - Se aislaron cultivos primarios de miocitos cardíacos adultos humanos y fibroblastos cardíacos adultos humanos a partir de pacientes que no padecían FRDA pero habían sido sometidos a trasplante cardíaco como describen Macfelda et al. (8). Las células se cultivaron en medio M199 que contenía suero de ternera fetal al 10% así como 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 10 μ g/ml de transferrina y 10 μ g/ml de insulina a 37°C en atmósfera humidificada de CO₂ al 5%.

Células neuronales - El clon P19 se obtuvo de la Colección de Cultivos Celulares Europea (ECACC Núm. Cat. 95102707, Salisbury, Reino Unido). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado α (α -MEM) con un suplemento de suero de ternera al 7,5% (Euroclone, Viena, Austria) y suero bovino fetal al 2,5% (Gibco, Viena, Austria), L-glutamina 2 mM, 10 ml/l de aminoácidos esenciales y antibióticos en una cámara humidificada con CO₂ al 5%. La diferenciación celular se llevó a cabo como describen Santos et al. (9).

Inmunotransferencia de frataxina

La expresión de la frataxina se detectó mediante Transferencia Western. Después del tratamiento con rhuEPO durante los períodos indicados y después de lavados exhaustivos las células se lisaron con reactivo de lisis para cultivos celulares (Promega, Viena, Austria) y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga. Se separaron 50 microgramos de proteínas en electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS (dodecilsulfato de sodio) al 12% en condiciones no reductoras utilizando una solución Prosieve 50 Gel (BMA, BioWhittaker de Biozym, Viena, Austria) y tampón de electroforesis Tris/Tricina (Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS al 0,1%, pH 8,3) y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. El anticuerpo primario se dirigió contra la frataxina madura (7) y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo HRP anti-conejo de cabra (1:10000) (DAKO).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism. Las diferencias se examinaron para determinar la significación estadística utilizando la prueba de la t. Las diferencias significativas son marcadas en las figuras con * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$). Se supuso que las diferencias con $p < 0,05$ eran significativas.

Ejemplo 1

Efectos de rhuEPO sobre la expresión de frataxina en linfocitos aislados de pacientes con FRDA

Se incubaron linfocitos recién aislados obtenidos de 7 pacientes con ataxia de Friedreich (repeticiones GAA que oscilaban de 240 - 800) con diferentes concentraciones de rhuEPO durante 24 horas. Los productos lisados celulares (50 μ g proteína) se separaron en electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones no reductoras utilizando tampón de electroforesis de Tris/Tricina (Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS al 0,1%) y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se llevó a cabo el análisis de transferencia Western con un anticuerpo policlonal contra frataxina humana.

Las Figs. 1A y 1B muestran el análisis densitométrico de la transferencia Western de la expresión de la frataxina de tres experimentos independientes. La densidad de la banda de frataxina del control (linfocitos no tratados en ausencia de rhuEPO del mismo paciente) se ajustó como 1 u.a. (unidades arbitrarias). Los valores representan las medias \pm ETM de 3 experimentos diferentes. Se examinaron las diferencias para determinar la significación estadística utilizando la prueba de la t pareada. Las diferencias significativas vs. control son marcadas en las figuras con * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$).

A partir de la Fig. 1B se puede observar que el incremento en la expresión de la frataxina se corresponde con una concentración creciente de rhuEPO. La Fig. 1A representa una transferencia Western para la frataxina de un paciente con FRDA, en la que los linfocitos aislados se trataron con diferentes concentraciones de rhuEPO durante 24 horas.

Ejemplo 2

Efectos de rhuEPO sobre la expresión de frataxina en cardiomiocitos y cardiofibroblastos humanos

El corazón es uno de los órganos más afectados en los pacientes con FRDA, por lo tanto, los autores de la presente invención investigaron los efectos de la rhuEPO sobre la expresión de la frataxina en cultivos primarios de miocitos cardíacos adultos humanos (HACM) y cardiofibroblastos, preparados a partir de tejido ventricular obtenido de corazones de donantes de pacientes que habían sufrido transplante de corazón (8).

La Fig. 2 muestra la expresión de frataxina en células de corazón humanas primarias. Se incubaron cultivos primarios de miocitos cardíacos adultos humanos (Fig. 2A) y fibroblastos cardíacos (Fig. 2B), con rhuEPO durante 48 horas. Los productos lisados celulares (40 μ g de proteína) se separaron en electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones no reductoras utilizando tampón de electroforesis de Tris/Tricina (Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS al 0,1%) y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. El análisis de transferencia Western se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal contra frataxina humana. Se muestra el análisis densitométrico de la expresión de la frataxina de tres experimentos independientes. La densidad de la banda de frataxina del control (en ausencia de rhuEPO) se ajustó a 1 u.a. (unidades arbitrarias). Los valores representan las medias \pm ETM de 3 experimentos diferentes. Algunas de las barras de error son más pequeñas que los símbolos. Se examinaron las diferencias para determinar la significación estadística utilizando la prueba de la t pareada. Las diferencias significativas vs. control son marcadas en las figuras con * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$).

A partir de la Fig. 2A se puede observar un incremento significativo en la expresión de la frataxina en cardiomiocitos primarios humanos (Fig. 2A) y cardiofibroblastos (Fig. 2B) después de la incubación con rhuEPO.

Ejemplo 3

Efectos de la rhuEPO sobre la expresión de frataxina neuronal

5 Se diferenciaron células de carcinoma embrionario de ratón P19 en células neuronales (9). Para investigar la influencia de la rhuEPO sobre la expresión de la frataxina, se incubaron las células con rhuEPO durante 24 h (Fig. 3A) y 48 h (Fig. 3B). Los productos lisados celulares (50 µg de proteína) se separaron en electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones no reductoras utilizando tampón de electroforesis de Tris/Tricina (Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS al 0,1%) y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. El análisis de transferencia Western se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal contra frataxina humana, que también detecta frataxina de ratón debido al 94% de homología de secuencia. Se muestra el análisis densitométrico de la transferencia Western de la expresión de la frataxina de estos tres experimentos. La densidad de la banda de frataxina del control (en ausencia de rhuEPO) se ajustó a 1 u.a. (unidades arbitrarias). Los valores representan las medias ± ETM de 3 experimentos diferentes. Las diferencias se examinaron para determinar la significación estadística utilizando la prueba de la t pareada. Las diferencias significativas vs. control son marcadas en las figuras con * (p<0,05) y ** (p<0,01).

20 A partir de la Fig. 3 se puede observar que en las células P19 existe un incremento significativo de la expresión de la frataxina después de la incubación con rhuEPO durante 24 horas (Fig. 3A) y 48 horas (Fig. 3B). La expresión de frataxina se incrementó hasta 2,5 veces cuando las células se trataron con rhuEPO durante 24 horas en comparación con las células de control no tratadas.

Ejemplo 4

Efectos de la incubación breve con rhuEPO sobre la expresión de la frataxina neuronal

25 Este ejemplo muestra el efecto de la incubación breve con rhuEPO y el cultivo adicional en ausencia de rhuEPO sobre la expresión de la frataxina neuronal. Se incubaron células P 19 (tipo neuronal) con rhuEPO durante 1 hora. Después de los lavados, las células se incubaron adicionalmente en ausencia de rhuEPO durante 48 horas. Los productos lisados celulares (50 µg de proteína) se separaron en electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% en condiciones no reductoras y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. El análisis de transferencia Western se llevó a cabo con un anticuerpo policlonal contra frataxina humana. Las Figs. 4A y 4B muestran la transferencia Western y el análisis densitométrico de la transferencia Western de la expresión de la frataxina, respectivamente, de tres experimentos independientes. La densidad de la banda de frataxina del control (linfocitos no tratados en ausencia de rhuEPO del mismo paciente) se ajustó a 1 u.a. (unidades arbitrarias). Los valores representan las medias ± ETM de 3 experimentos diferentes. Las diferencias se examinaron para determinar la significación estadística utilizando la prueba de la t pareada. Las diferencias significativas vs. control son marcadas en las figuras con * (p<0,05) y ** (p<0,01).

35 A partir de la Fig. 4 se puede observar que la incubación breve (durante 1 hora) de las células neuronales P19 con rhuEPO y el cultivo adicional en ausencia de rhuEPO fue suficiente para observar el mismo incremento en la expresión de frataxina después de 48 horas que en las células incubadas durante todo el tiempo con rhuEPO. Estos descubrimientos indican que los derivados de eritropoyetina con una vida media en plasma corta tales como la asialoeritropoyetina también podrían ser eficaces para incrementar la expresión de frataxina en mamíferos.

40 Referencias:

1. Mateo I, Llorca J, Volpini V, Corral J, Berciano J, Combarros, et al. GAA repeats and clinical variation in Friedreich's ataxia. *Acta Neurol Scand* 2004;109: 75-78.
2. Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, Cova L, Hindelang C, Jiralerspong S. Frataxin is reduced in Friedreich's ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1771-1780.
- 45 3. Tan G, Chen LS, Lonnerdal B, Gellera C, Taroni FA, Cortopassi GA. Frataxin expression rescues mitochondrial dysfunctions in FA cells. *Hum Mol Gen* 2001; 19: 2099-2107.
4. Puccio H, Simon D, Cossee M, Criqui-Filipe P, Tiziano F, Melki J. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet* 2001; 27: 181-186.
- 50 5. Bradley JL, Blake JC, Chamberlain S, Thomas PK, Cooper JM, Schapira AHV. Clinical, biochemical and molecular genetic correlations in Friedreich's ataxia. *Hum Mol Gen* 2000;9: 275-282.
6. Turano M, Tammaro A, De Biase I, Lo Casale MS, Ruggiero G, Monticelli A. 3-Nitropropionic acid increases frataxin expression in human lymphocytes and in transgenic rat PC12 cells. *Neurosci Lett* 2003;350: 184-186.

7. Cavadini P, O'Neill HA, Benda O, Isaya G. Hum Mol Genet. 2002; 11: 217-27
8. Macfelda K, Weiss TW, Kaun C, Breuss JM, Zorn G, Obendorf U, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 expression is regulated by the inflammatory mediators interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta and oncostatin M in human cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 2002; 34: 1681-91.
- 5 9. Santos, MM, Ohshima, K. y Pandolfo, M. Frataxin deficiency enhances apoptosis in cells differentiating into neuroectoderm. Hum Mol Genet 2001; 10: 1935-1944.

REIVINDICACIONES

1. El uso de eritropoyetina humana o un derivado de la misma que tiene la actividad biológica de la eritropoyetina humana de incrementar la expresión de frataxina, cuyo derivado comprende cualquier polipéptido que tenga la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina pero difiera en el residuo azúcar de la eritropoyetina humana y cualquier variante de eritropoyetina seleccionada del grupo de eritropoyetina carbamilada (CEPO), asialoeritropoyetina, aranesp, S100-EPO y R103E-EPO, para la producción de una preparación farmacéutica para el tratamiento de la ataxia de Friedreich o una enfermedad asociada con la misma por una disminución de la expresión de la frataxina en un paciente que padece ataxia de Friedreich, en donde la ataxia de Friedreich ha sido diagnosticada por medio de análisis génico y/o ELISA y/o PCR en tiempo real y la expresión de frataxina disminuye debido a la expansión de la repetición GAA o mutaciones en uno o ambos alelos en el gen de la frataxina.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha eritropoyetina humana o dicho derivado de la misma son del grupo que consiste en eritropoyetina humana recombinante, eritropoyetina α , eritropoyetina β , aranesp, asialoeritropoyetina y eritropoyetina carbamilada.
3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es una enfermedad del corazón de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
4. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es la diabetes de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
5. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
6. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es una deformación ósea, en particular escoliosis y pie cavo, de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
7. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es el nistagmo de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
8. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es el deterioro auditivo de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
9. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es una enfermedad ocular, en particular atrofia óptica, de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
10. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque dicha enfermedad asociada con la ataxia de Friedreich es un cáncer de un paciente que muestra una disminución de la expresión de frataxina.
11. La eritropoyetina humana o un derivado de la misma que tiene la actividad biológica de la eritropoyetina humana de incrementar la expresión de frataxina, cuyo derivado comprende cualquier polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la eritropoyetina pero difiere en el residuo azúcar de la eritropoyetina humana y cualquier variante de eritropoyetina seleccionado del grupo de eritropoyetina carbamilada (CEPO), asialoeritropoyetina, aranesp, S100-EPO y R103E-EPO, para su uso en un método de tratamiento de la ataxia de Friedreich o de tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con la misma por la disminución de la expresión de la frataxina, en donde la ataxia de Friedreich se diagnostica por medio de análisis génico y/o ELISA y/o PCR en tiempo real y esa expresión de frataxina disminuye debido a la expansión de la repetición GAA o mutaciones en uno o ambos alelos en el gen de la frataxina.

Fig 1A

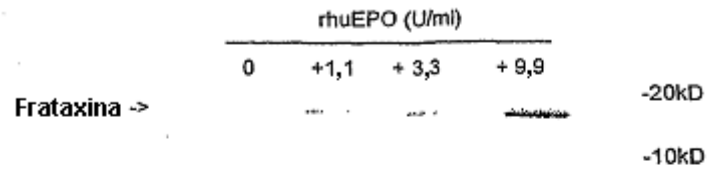


Fig. 1B

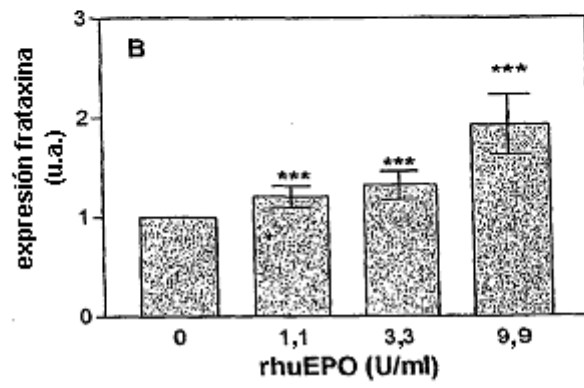


Fig. 2A

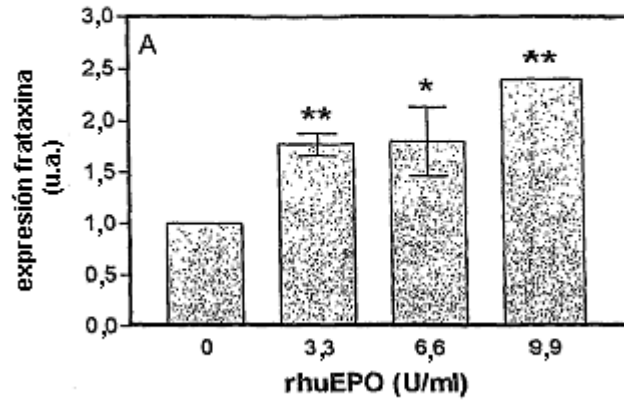


Fig. 2B

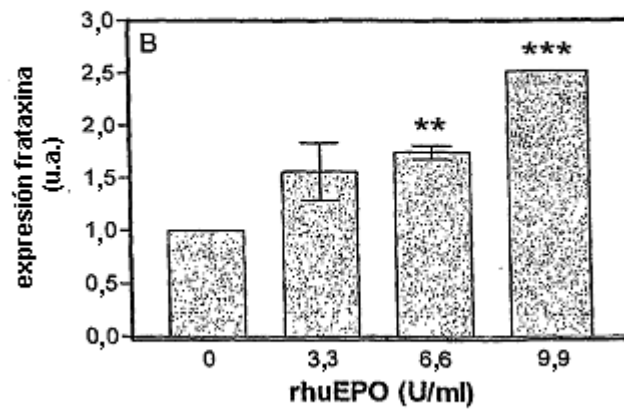


Fig. 3A

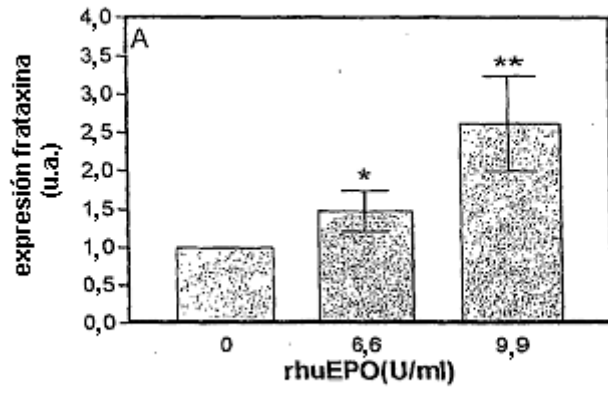


Fig. 3B

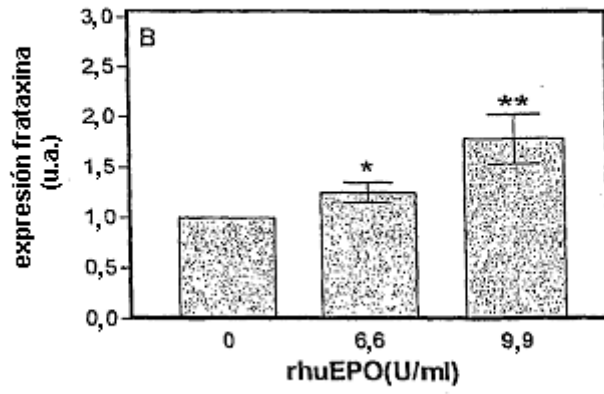


Fig. 4A

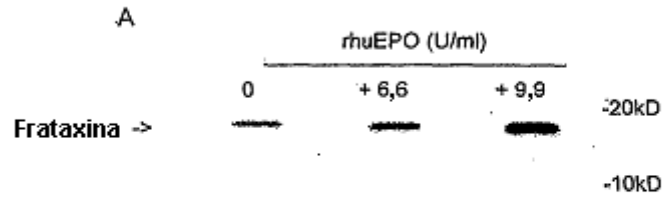


Fig. 4B

